

525, 974

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

28 FEB 2005

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2004年3月11日 (11.03.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/020657 A1

(51)国際特許分類⁷: C12Q 1/26, G01N 33/50, 33/15

(21)国際出願番号: PCT/JP2003/005797

(22)国際出願日: 2003年5月8日 (08.05.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2002-248909 2002年8月28日 (28.08.2002) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市 本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 小倉 尚志 (OGURA,Takashi) [JP/JP]; 〒678-1205 兵庫県 赤穂

郡 上郡町光都2-20-2、F-1 Hyogo (JP). 黒岩 繁樹 (KUROIWA,Shigeki) [JP/JP]; 〒155-0032 東京都世田谷区代沢1-1-10 小杉ビル301 Tokyo (JP). 吉川 信也 (YOSHIKAWA,Shinya) [JP/JP]; 〒678-1205 兵庫県赤穂郡上郡町光都2-20-2、A-22 Hyogo (JP).

(74)代理人: 下田 昭, 外 (SHIMODA,Akira et al.); 〒104-0031 東京都中央区京橋3-3-4 京橋日英ビル4階 Tokyo (JP).

(81)指定国(国内): US.

(84)指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCAVENGING INTERMEDIATE FORMED BY REACTION OF OXIDOREDUCTASE WITH SUBSTRATE

(54)発明の名称: 酸化還元酵素と基質との反応中間体を捕捉する方法

WO 2004/020657 A1

(57) Abstract: A method by which an intermediate formed by reaction of an oxidoreductase such as a cytochrome c oxidase is scavenged without fail. The method, which is for scavenging an intermediate formed from an oxidoreductase, comprises: a first step in which an oxidoreductase, a photoexcitable reducing agent which emits electrons upon irradiation with light, an amine type electron donor, and a substrate for the oxidoreductase are dissolved in water and mixed; a second step in which the mixture obtained in the first step is frozen by cooling to 70 to 270 K; a third step in which the frozen mixture obtained in the second step is irradiated at 70 to 270 K with light having wavelengths including an absorption wavelength for the metal complex; and a fourth step in which the frozen mixture treated in the third step is heated to a temperature which is in the range of 80 to 270 K and is higher than the temperature used in the third step.

(57) 要約: チトクロムc酸化還元酵素等の酸化還元酵素の反応中間体を確実に捕捉する。酸化還元酵素、光照射により電子を放出する光励起還元剤、アミン系電子供与体、及び該酸化還元酵素の基質を水に溶解させ混合する第1段階で生成した混合物を70~270Kに冷却して凍結する第2段階、第2段階で生成した凍結混合物に光を照射する第3段階、及び第3段階で生成した凍結混合物を80~270Kで前記金属錯体の吸収波長を含む波長の光を照射する第4段階から成る酸化還元酵素の反応中間体を捕捉する方法である。

明細書

酸化還元酵素と基質との反応中間体を捕捉する方法

5 技術分野

この発明は、チトクロム c 酸化酵素等の酸化還元酵素と基質との反応中間体を捕捉する方法に関する。

従来技術

10 チトクロム c 酸化酵素等の何らかの酸化還元反応を触媒する酵素の、酸化還元過程の中間体を捕捉することは、その反応機構を解明する上で極めて重要であるため、従来様々な試みがなされている。

例えは、還元型チトクロム c 酸化酵素に阻害剤として一酸化炭素を作用させて不活性化した後、-25°C程度の低温で酸素を加え、さらに低温にして凍結し、これに光を照射することにより阻害剤である一酸化炭素を解離させて、酸素との反応中間体を捉えることが報告されている (Chance, B., Saronio, C., Leigh, Jr., J. S., Ingledew, W. J., and King, T. E. (1978) Biochem. J., 171, 787-798)。この場合、阻害剤が副反応を起こす可能性を否定できず、また適切な阻害剤が存在しない酵素には適用できない。また、対象が結晶タンパク質の場合、基質を迅速に混合することは困難である等の問題があった。

また、室温で光照射により電子を放出する試薬であるルテニウム錯体を用いてチトクロム c 酸化酵素を光還元することが報告されている (Scott, R. A. and Gray, H. B. (1980) J. Am. Chem. Soc., 102, 3219-3224)。しかし、このような試薬を用いて上記文献のように低温で凍結して反応中間体を捕捉しようととしても、室温と違って試薬の拡散がないため光還元の効率が非常に悪いという問題がある。

また従来は、主として時間分解の分光学的測定を行って酵素と基質の反応中間体について議論していた。また、反応開始前や反応終了後などの結晶タンパク質を用いたX線結晶構造解析の結果から反応中間体のタンパク質の構造に関して推

論を行っていた。

発明が解決しようとする課題

本発明は、酸化還元酵素と基質を含む水溶液が凍結するような低温において、
5 光照射により電子を放出する光励起還元剤によりチトクロム c 酸化酵素等の酸化
還元酵素を十分に還元し、酸化還元酵素の反応中間体を確実に捕捉する方法であ
って、従来のように酵素の阻害剤を用いることなく、結晶状態の酵素の反応中間
体も低温捕捉の対象とすることができる方法を提供する。

課題を解決するための手段

上記の課題を解決するために、基質を含む酵素溶液を低温で反応させ、そのた
めに光照射により電子を放出する試薬を用い、これに光を照射して、酵素を還元
することにより反応を開始させる。この反応を低温で行うため、試薬の拡散がほ
とんどなく光還元の効率は悪いが、光化学反応試薬に電子を供給するアミン系電
子供与体を用いることで完全に還元できる条件を見出した。このようにして酸化
15 還元酵素の反応中間体を確実に捕捉することに成功した。

本発明の方法においては、阻害剤による副反応を避け、また適切な阻害剤が存
在しない酵素にも適用するために、阻害剤を使用せずに酵素と基質との反応を低
温で開始させ、反応中間体を低温で捕捉する。この場合、基質を酵素と混合する
20 時点では反応は起こらないので迅速に混合する必要がなくなり、対象が結晶タン
パク質でも良く、将来反応中間体のX線結晶構造解析を行うための道が開ける。

即ち、本発明は、酸化還元酵素、光照射により電子を放出する光励起還元剤、
アミン系電子供与体、及び該酸化還元酵素の基質を水に溶解させ混合する第1段
階、第1段階で生成した混合物を70～270Kに冷却して凍結する第2段階、
25 第2段階で生成した凍結混合物に70～270Kで前記金属錯体の吸収波長を含
む波長の光を照射する第3段階、及び第3段階で生成した凍結混合物を80～2
70Kであって第3段階の温度より高い温度へ昇温する第4段階から成る酸化還
元酵素の反応中間体を捕捉する方法である。

図面の簡単な説明

第1図は、チトクロムc酸化酵素の低温吸収スペクトルを示す。

発明の実施の形態

5 第1段階では、酸化還元酵素、光照射により電子を放出する光励起還元剤、アミン系電子供与体、及び該酸化還元酵素の基質の各成分を水に溶解させる。このうち基質が気体の場合には他の成分を混合した溶液に、後で別途この気体を吹き込んでもよい。

酸化還元酵素は、何らかの酸化還元反応を触媒する酵素であり、国際生化学連
10 合（I U B）の酵素委員会によって定められた酵素分類の主群の1つEC1群である。例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ、ヒドログナーゼ、一酸化窒素還元酵素、脱窒素酵素群（硝酸レダクターゼ、亜硝酸レダクターゼ、酸化窒素レダクターゼ、亜酸化窒素レダクターゼ）、P450スーパーファミリー（P450nor, P450scc, P450camなど）、キノール酸化酵素、ミトコンドリア内膜電子伝達系酵素（複合体I, 複合体II, チトクロム bc_1 複合体, チトクロムc酸化酵素など）、光合成電子伝達系酵素（チトクロム b_6f 複合体、Fd-NADP⁺レダクターゼなど）、酸素添加酵素（トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ、フェニルアラニン4モノオキシゲナーゼなど）、ヒドロペルオキシダーゼ（カタラーゼ、ペルオキシダーゼ）などが挙げられ、上記酵素及びそれらのアミノ酸の点変異体も含まれる。水溶液
15 中の酸化還元酵素の濃度は約1μM～10mMである。

光照射により電子を放出する光励起還元剤として、例えば、ルテニウム錯体（[Ru(bipyridine)₃]²⁺、[Ru(NH₃)₆]²⁺など）のような遷移金属錯体、炭化水素類（ペリレン及びその誘導体、ピレン及びその誘導体など）、各種色素（ポルフィリン（Zn、Mg及び金属イオンを持たないもの）、pH指示薬（メチレンブルー、アクリジンオレンジなど）、メチルビオローゲンなど）が挙げられる。

25 例えば、[Ru(bipyridine)₃]²⁺には452nm及び426nmに吸収ピークがあるので、これらの波長が含まれる光を照射し、これを励起する。水溶液中の光励起還元剤の量は酵素の還元当量の2～10倍ほどの濃度が必要であり、低温では光還元の効率が悪いため余分に試薬が必要となるため、その濃度は約1μM

～100 mMである。

基質は、上記酸化還元酵素によって触媒作用を受ける化合物であり、電子を受け取ることによって還元される物質である。キノール酸化酵素及びチトクロムc酸化酵素の場合は酸素、一酸化窒素還元酵素の場合は一酸化窒素、P450スル5ペーファミリーの場合は酸素と一酸化炭素や有機化合物（例えば、コレステロール、ショウノウなど）である。また、酵素本来の生理的基質以外の電子受容体を用いてもよい。水溶液中の基質の濃度は約1 μM～20 mMである。

アミン系電子供与体は、光励起還元剤が電子を放出した後に酸化型となった光化学反応試薬へ電子を供給して再生する、アミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基等を有するアミン系化合物である。このアミン系電子供与体は、基質や酵素へ行った電子が再び光化学反応試薬に戻る反応を防ぐ役割を持ち、比較的安定だが光化学反応試薬によって電子を奪われる。アミン系電子供与体として、例えば、エチレンジアミン四酢酸、トリエタノールアミン、L-시스ティン、アニリン、N,N-ジメチルアニリン等が挙げられる。これらを複数組み合わせて用いてもよい。15水溶液中のアミン系電子供与体の濃度は約1 mM～100 mMである。

この水溶液は、必要に応じて、更に、pH緩衝剤、可溶化剤、その他の試薬を含んでもよい。

pH緩衝剤としては、リン酸緩衝液やGordの緩衝液などを用いてもよく、上記酸化還元酵素が正常に機能できる範囲内にpHを保つ（pH 1～14）役割をする。pH緩衝剤の濃度は光励起還元剤の反応に伴うpH変化を抑えるために光励起還元剤の濃度よりも高いほうがよく、1～200 mM程度である。

可溶化剤としては、上記酸化還元酵素が水溶性タンパク質ではない場合、可溶化剤として界面活性剤（n-decyl-β-D-maltopyranoside、n-dodecyl-β-D-maltopyranoside、コール酸、Triton X-100など）を用いてもよい。その濃度は0～1% (W/V) 程度である。

なお、各成分の濃度は目的の酵素が正常に機能できる範囲内の濃度に適宜調整することが望ましい。

第2段階では、第1段階で生成した混合液を冷却し凍結させる。この温度は70 K～270 K、つまり水溶液が凍っている温度で光還元が可能な温度である。

この温度は、基質が混合物中で拡散を開始する温度（「拡散開始温度」という。）より低い温度にすることが好ましいが、液体窒素温度（77K）とすることが簡便である。拡散開始温度は、基質固有の温度であり、本発明のような条件下ではほぼ一定である。拡散開始温度は、例えば、本実施例等のデータより知ることができるが、酸素の場合には170K、一酸化炭素の場合には140～170Kの間である。
5

第3段階では、凍結混合物に光を照射する。光励起された光励起還元剤は電子を放出し、酸化還元酵素は電子を受け取り、還元される。この段階の温度は、第2段階と同じでもよいが、基質との反応が進行しないという観点から温度拡散開始温度より低い温度が好ましく、更に、この範囲内でできるだけ高いほうが、還元反応促進から好ましい。従って、この段階の温度は、好ましくは拡散開始温度より低い温度、より好ましくは拡散開始温度から5～20K低い温度である。
10

第4段階では、前段階よりも昇温して、還元型の酸化還元型酵素と基質とを反応させて、反応中間体を形成させる。但し、余り温度を高くすると反応が進行して、反応中間体の状態に留まることができないため、拡散開始温度以上のできるだけ低い温度が好ましい。従って、この段階の温度は、前段階の温度よりも高い温度であって、好ましくは拡散開始温度以上、但し270K以下の温度、より好ましくは拡散開始温度～拡散開始温度+50Kの範囲の温度、更に好ましくは拡散開始温度～拡散開始温度+30Kの範囲の温度、最も好ましくは拡散開始温度
15
20 にする。

本発明の方法においては、第4段階の後に、この段階で生成した凍結混合物を拡散開始温度より低い温度に冷却する第5段階を付加してもよい。反応中間体を保持するためである。この温度は通常液体窒素温度（77K）とすることが簡便である。

25

発明の効果

(1) 本発明の方法は、以下のようにタンパク質工学へ応用することができる。

既存の酵素タンパク質でも同様であるが、将来人工的に酸化還元反応を伴って機能する酵素を設計した場合、低温で反応中間体を捉える技術は重要となる。これ

によって酵素の機能を検定・評価する場合にX線結晶構造解析を行って反応途中の酵素の構造を決定することが容易になる。

従来技術では反応中間体を固定できる酵素は、酵素自身で低温で光化学反応を開始できるものを除けば、阻害剤又は改変した基質がうまく利用できるものに限られていた。それ以外には、反応中間状態で反応が停止してしまうように酵素本体を改変してしまうしかなかった。しかし、タンパク質自体に手を加えた場合構造が変わってしまう可能性も否定できず、都合の良い改変方法もあるとは限らなかった。この場合、分光学的手法を用いて議論するしかないが、分光学的手法をもってしても反応中のタンパク質のあらゆる部分の構造変化までは情報を得られるわけではない。

本発明は、阻害剤や酵素の改変等を必要としない反応中間体固定法であり、利用可能な酵素の範囲が広がった。また、光感受性のより高い光化学反応試薬、光化学反応試薬と電子供与体を結合させた試薬等を開発することによって、低温でパルス光を用いて1電子だけを酵素に与え、1電子分ごとの反応を起こさせて酵素反応を段階ごとに検査することが可能になることも期待できる。

(2) また本発明の方法は、低温酸素検出装置に利用することができる。

酸素を基質とする酵素を用いて、酸素電極が利用できない、溶液が凍っている状態で微量の酸素の濃度を検出する装置を作ることができる。

(3) 更に、本発明の方法は、微量一酸化窒素検出装置に応用することができる。

生体内で生じる一酸化窒素は不安定であるが、生体試料と一酸化窒素還元酵素(酸化型)と光化学反応試薬等をすばやく混合した後、凍結して光還元を行い、温度を上げて一酸化窒素と反応させることによって、分光学的に微量の一酸化窒素を検出することができる。

以下、実施例にて本発明を例証するが、本発明を限定することを意図するものではない。

実施例1

本実施例では、以下の手順で、チトクロムc酸化酵素が基質(酸素)を還元する反応中間体を捕捉した。

(1) 0.2 % n-decyl- β -D-maltopyranoside (Anatrace より購入) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) にチトクロム c 酸化酵素 (既報 (Yoshikawa et al. (1977) Journal of Biological Chemistry, 252, 5498-5508) に記載の方法に従って調製した。) 20 μ Mを溶かす。

5 (2) (1) の溶液に酸素を吹き込んで飽和させる。

(3) (2) の溶液にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (和光純薬製) とアニリン (関東化学製) をそれぞれ 20 mM と 5 mM になるように添加する。

(4) (3) の溶液に暗所で tris(2,2'-bipyridine)dichlororuthenium(I I) (sigma より購入) 100 μ Mを添加した後、液体窒素中で凍結する。

10 (5) (4) の溶液の温度を 140 K に上げて 150 W ハロゲンランプで 4 時間光 照射を行う (波長範囲: 400~800 nm、積算光エネルギー: $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^6$ J)。

このときの吸収スペクトルを第 1 図に示す。(A) に示すように、603 nm 付 近に吸収のピークが見られるが、この近辺には用いた試薬由来の吸収はなく、チ トクロム c 酸化酵素の還元型の吸収のピークに一致している。光照射によってル 15 テニウム錯体は光励起されて電子を放出し、チトクロム c 酸化酵素に電子を渡し、 チトクロム c 酸化酵素は還元型となっている。

なお、電子を放出したルテニウム錯体は強力な酸化剤であり、このままでは還 元型チトクロム c 酸化酵素から電子を奪う逆反応が起きて反応が前に進まない。 室温の溶液中での反応では、適当に電子供与体となる物質を入れておくことで酸 20 化型ルテニウム錯体を再還元していたが、低温で凍結していく分子の拡散が少 ない状態では電子を酸化型ルテニウム錯体に渡すことが難しかったが、本発明にお いてはアミン系の電子供与体 (エチレンジアミン四酢酸とアニリンとの混合物) を使うことでこの問題を解決した。この結果、チトクロム c 酸化酵素の 100 % 光還元が完了した。

25 (6) (5) で得たチトクロム c 酸化酵素の還元型を 180 K で 5 時間置いて酸素 と反応させる。第 1 図 (B) に示すように吸収極大の移動が見られる。第 1 図 (C) は (B) - (A) を計算したものである。

180 K まで温度を上げると酸素分子が少しずつ拡散し始めて、還元型になっ たチトクロム c 酸化酵素の活性中心であるヘム α_3 のヘム鉄に酸素分子が結合す

る。その結果、酸素化型反応中間体である $\text{Fe}^{3+}-\text{O}^{2-}$ (Fe^{3+} はヘム a_3 のヘム鉄) が生じる。第1図 (C) に示す酸素と反応後一反応前の差スペクトルの形状は酸素化型反応中間体として過去報告されてきたのものと一致する (Biochem. J., 171, 787-798 (1978)、T. Ogura et al. (1990) J. Am. Chem. Soc., 112, 5630-5631.)

5 第1図において、反応中間体 (B) と還元型酵素 (A) の差スペクトルを計算したところ、595 nm の付近に吸収の増加 (山) が見られ、606 nm 付近に吸収の減少 (谷) が見られた (C)。これは酸素を除いた嫌気的条件下では現れない。これは酸素との反応によって、反応前に 606 nm 付近に吸収があったものが反応後に 595 nm の付近に吸収が移動したことを見た。このことは還元型ヘム a_3 が酸素によって何かに変化したことを意味する。

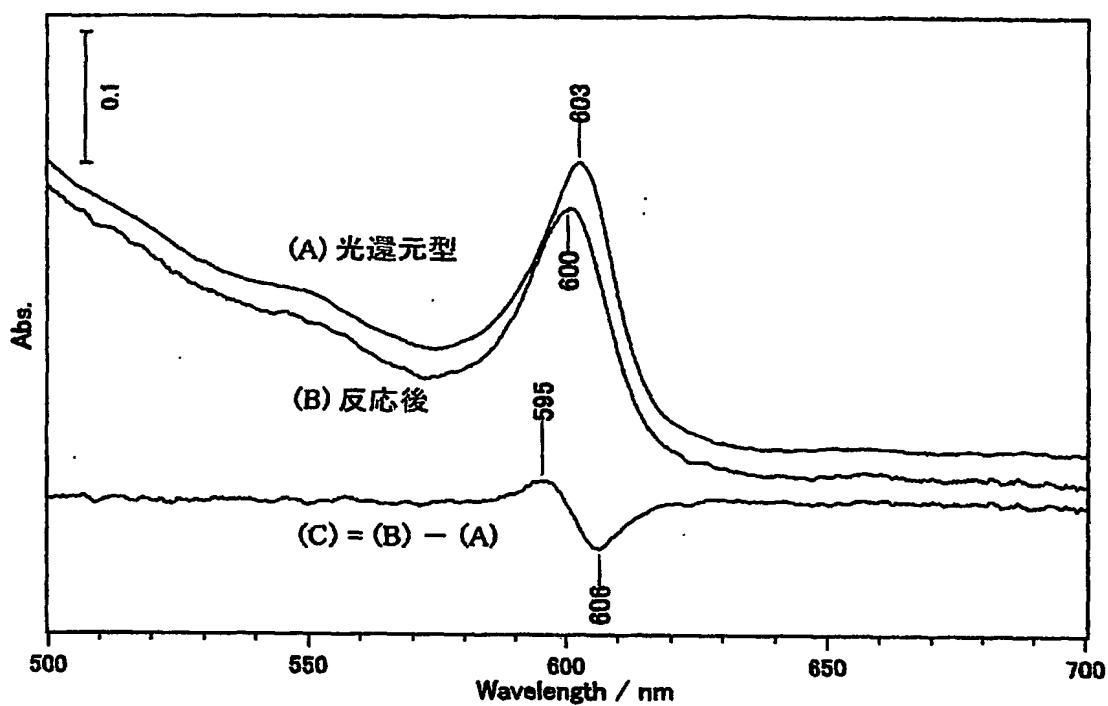
10 Chance らの報告 (Biochem. J., 171, 787-798 (1978)) にあるように酸素化型反応中間体 (文献では compound A) が生じたときは 591 nm の付近に吸収の増加が見られ、611 nm 付近に吸収の減少が見られる。実験条件の違い (酵素標品の違い、可溶化剤の有無、測定温度の違い、生じた反応中間体の量の違い) を考慮に入れれば、酸素化型反応中間体が生じたと考えられる。

請求の範囲

1. 酸化還元酵素、光照射により電子を放出する光励起還元剤、アミン系電子供与体、及び該酸化還元酵素の基質を水に溶解させ混合する第1段階、第1段階で生成した混合物を70～270Kに冷却して凍結する第2段階、第2段階で生成した凍結混合物に70～270Kで前記金属錯体の吸収波長を含む波長の光を照射する第3段階、及び第3段階で生成した凍結混合物を80～270Kであつて第3段階の温度より高い温度へ昇温する第4段階から成る酸化還元酵素の反応中間体を捕捉する方法。
10
2. 第2段階において第1段階で生成した混合物を、前記基質が該混合物中で拡散を開始する温度（以下「拡散開始温度」という。）より低い温度に冷却し、第3段階において第2段階で生成した凍結混合物に拡散開始温度より低い温度で光を照射し、第4段階において第3段階で生成した凍結混合物を、拡散開始温度以上、但し270K以下の温度へ昇温する、請求項1に記載の方法。
15
3. 第3段階において第2段階で生成した凍結混合物に拡散開始温度より5～20K低い温度で光を照射し、第4段階において第3段階で生成した凍結混合物を、拡散開始温度～拡散開始温度+50Kの範囲の温度、但し270K以下の温度へ昇温する、請求項2に記載の方法。
20
4. 更に、第4段階で生成した凍結混合物を拡散開始温度より低い温度に冷却する第5段階を含む請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

1/1

第1図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/26, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-70, C12N9/00-99, G01N33/00-98, C07C229/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 08-92179 A (Cosmo Research Institute, et al.), 09 April, 1996 (09.04.96), (Family: none)	1-4
A	JP 06-271519 A (Cosmo Research Institute, et al.), 27 September, 1994 (27.09.94), & EP 607952 A1 & US 5380935 A	1-4
A	Stach P., et al., "Bacterial cytochrome c nitrite reductase: new structural and functional aspects.", J.Inorg.Biochem., Vol.79, Nos. 1 to 4, (2000), pages 381 to 385	1-4
A	Powers L., et al., "Multiple structures and functions of cytochrome oxidase.", J.Inorg.Biochem., Vol.23, Nos. 3 to 4, (1985), pages 207 to 217	1-4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 June, 2003 (30.06.03)Date of mailing of the international search report
15 July, 2003 (15.07.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C17 C12Q 1/26, G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C17 C12Q 1/00~70, C12N 9/00~99, G01N33/00~98, C07C229/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 08-92179 A (株式会社コスモ総合研究所 外1名) 1996.04.09 (ファミリーなし)	1-4
A	JP 06-271519 A (株式会社コスモ総合研究所 外1名) 1994.09.27 & EP 607952 A1 & US 5380935 A	1-4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.06.03

国際調査報告の発送日

15.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

齊藤 真由美

4B 8931



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Stach P., et al., "Bacterial cytochrome c nitrite reductase: new structural and functional aspects.", J. Inorg. Biochem. Vol. 79, No. 1-4, (2000), p. 381-385	1 - 4
A	Powers L., et al., "Multiple structures and functions of cytochrome oxidase.", J. Inorg. Biochem. Vol. 23, No. 3-4, (1985), p. 207-217	1 - 4